

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**  
**CAPACIDAD LARVICIDA CONTRA *Aedes aegypti* POR COMPUESTOS**  
**BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS AISLADOS DE**  
**DIFERENTES AMBIENTES TERRESTRES Y ACUÁTICOS**

**POR**

**DANIELA CERDA APRESA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN**  
**MICROBIOLOGÍA**

**Noviembre, 2020**

**CAPACIDAD LARVICIDA CONTRA *Aedes aegypti* POR COMPUESTOS  
BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS AISLADOS DE DIFERENTES  
AMBIENTES TERRESTRES Y ACUÁTICOS**

**Comité de Tesis**



---

**Dra. Katiushka Arévalo Niño**

Presidente



---

**Dr. José Santos García Alvarado**

Secretario



---

**Dra. Luisa Yolanda Solís Soto**

Vocal 1



---

**Dra. Verónica Almaguer Cantú**

Vocal 2



---

**Dra. Ma. Guadalupe Rojas Verde**

Vocal 3

**CAPACIDAD LARVICIDA CONTRA *Aedes aegypti* POR COMPUESTOS  
BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS AISLADOS DE DIFERENTES  
AMBIENTES TERRESTRES Y ACUÁTICOS**

**Dirección de Tesis**



---

**Dra. Katiushka Arévalo Niño**

Presidente



---

**Dra. Ma. Guadalupe Rojas Verde**

Codirectora

## **AGRADECIMIENTOS**

## **DEDICATORIAS**

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT.....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1 Descripción de Ae. aegypti.....	3
2.2 Situación mundial .....	4
2.3 Situación en México .....	4
2.4 Situación en Nuevo León.....	5
2.5 Métodos de Control .....	6
2.6 Control Químico .....	6
2.7 Control Biológico .....	7
<b>2.8 Nuevas Alternativas.....</b>	<b>8</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>10</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>6. METODOLOGÍA.....</b>	<b>12</b>
6.1 Microorganismos .....	12
6.2 Aislamiento y activación de actinomicetos .....	12
6.3 Evaluación de actividad quitinasa.....	12
6.5 Evaluación de actividad lipasa.....	13
6.6 Evaluación de actividad esterasa .....	13
6.7 Determinación de actividad antimicrobiana .....	13
6.8 Extracción y purificación de ADN .....	14
6.9 Detección del gen PKS .....	14
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>16</b>
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>36</b>

<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>37</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>42</b>
Anexo 1 .....	42
Anexo 2.....	43
Anexo 3.....	44
Anexo 4.....	45
Anexo 5.....	46
Anexo 6.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Origen y tipo de muestra de actinomicetos nativos	16
2	Actividad enzimática de actinomicetos aislados en las diferentes pruebas	19
3	Inhibición de bacterias patógenas por actinomicetos nativos	24
4	Cepas de actinomicetos utilizados para identificación del gen PKS	29



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Aislamiento en agar avena de actinomicetos nativos provenientes de Chiapas, México (a), Lago Arareco, Chihuahua (b), Sahara, África (c) y Forty Whyte, Canadá (d).	17
2	Actividad enzimática de quitinasa en agar quitina. Se evaluó su crecimiento y halos de degradación de los diferentes actinomicetos.	17
3	Actividad enzimática de proteasa en agar leche, donde se puede observar claramente un resultado positivo debido a la degradación del sustrato por parte del actinomiceto.	18
4	Actividad enzimática de lipasa en agar rojo, donde se observa un cambio de color en el medio de rojo a amarillo.	18
5	Actividad enzimática de esterasa en agar Tween 20 (a) y Tween 80 (b), donde se observa la precipitación de sales de calcio del medio	19
6	Actividad antimicrobiana de actinomicetos contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> (a), <i>S. aureus</i> (b), <i>S. enteritidis</i> (c) y <i>S. Typhimurium</i> (d).	23
7	Amplicones de PCR mediante electrophoresis en gel de agarosa al 0.7% utilizando GelRed. Imagen revelada mediante un transluminador UV (MultiDoc-It Digital Imaging System by UVP) Carril 1: Marcador, Carriles 2-10: Muestras (1 -9) (a), Muestras (10-18) (b), Muestras (19-28) (c), Muestras (29-37) (d), Muestras (38-46) (e) y Muestras (47-55) (f).	28

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ae.	Aedes
PKS	Policétido sintasa
DENV	Virus del dengue
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CHI	Chiapas
LAR	Lago Arareco
SHA	Sahara
NEV	Nevada
FW	Forty Whyte
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotásico
NaNO <sub>3</sub>	Nitrato de sodio
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de hierro heptahidratado
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
KOH	Hidróxido de potasio
UV	Luz ultravioleta
mM	Milimolar

## RESUMEN

En la actualidad, las enfermedades como dengue, zika y chikungunya son transmitidas por el vector *Aedes aegypti*, las cuales han incrementado año con año, donde se estima que alrededor de 390 millones de infecciones ocurren cada año y 500,000 resultan en casos graves donde el 2.5% termina en muerte, por lo cual, se buscan medidas de control para erradicar dicho vector. Existen métodos de control como insecticidas sintéticos que son ampliamente utilizados para controlar el desarrollo del mosquito, sin embargo, dichos organismos han generado resistencia a ellos, lo cual dificulta su control. Debido a lo anterior, en el presente estudio se emplearon actinomicetos para proponerlos como posibles agentes de biocontrol. Su principal ventaja es la producción de enzimas, así como una serie de compuestos bioactivos que pueden actuar como larvicidas potenciales de mosquito. Dichos compuestos son producto del metabolismo primario y secundario y muestran diferentes actividades tales como antimicrobianas, antiparasitarias, antitumorales, etc. Se aislaron microorganismos de diferentes regiones tales como Chiapas (México), Lago Arareco (Chihuahua), Sahara (África), Nevada (E.U.A) y Forty Whyte (Canadá) provenientes de diferentes ecosistemas. Se realizó una caracterización enzimática determinando actividad quitinolítica, proteolítica, lipasa y esterasa, al ser relacionadas con actividad insecticida. Se seleccionaron 85 actinomicetos, los cuales dieron positivo en al menos cuatro de las cinco pruebas enzimáticas, destacando las cepas CHI 10, CHI 27, CHI 42, LAR 16, SHA 2, NEV 39, FW 41 al tener un índice de degradación  $>2$  para la actividad quitinolítica. Para la actividad proteasa las cepas CHI 42, 112, y 123 y LAR 8, presentaron dicha actividad a las 24 h de incubación. Por otro lado, para las pruebas de lipasa y esterasa, el 85% y 95%, respectivamente, de los actinomicetos estudiados dio positivo para dichas enzimas. Adicional a ello, se evaluó la actividad antimicrobiana de 42 actinomicetos, los cuales en 37 de ellos resultaron en nula actividad inhibitoria, mientras que las cepas CHI 27, 29, 30, 49 así como FW 42, tuvieron actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos de interés como *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *S. enteritidis* y *S. Typhimurium*. Por los resultados obtenidos, se sugiere que estos actinomicetos pueden ser empleados para ensayos posteriores contra *Ae. aegypti* para evaluar su actividad insecticida y proponerlos como alternativa para el control de este vector.

## ABSTRACT

Nowadays, diseases such as dengue, zika and chikungunya are transmitted by the vector *Aedes aegypti*, which have increased year by year, where it is estimated that around 390 million infections occur each year and 500,000 result in severe cases where 2.5% end in death, so control measures are sought to eradicate this type of vector. There are control methods such as synthetic insecticides that are widely used to control mosquito development, however, these organisms have generated resistance, making difficult their control. Because of the above, this study uses actinomycetes to propose them as possible biocontrol agents. Its main advantage is the production of enzymes, as well as a number of bioactive compounds that can act as potential mosquito larvicides. These compounds are the products of primary and secondary metabolism and show different activities such as antimicrobial, antiparasitic, antitumoral, etc. Microorganisms from different regions such as Chiapas (Mexico), Lake Arareco (Chihuahua), Sahara (Africa), Nevada (USA) and Forty Whyte (Canada) from different ecosystems were isolated. An enzymatic characterization was performed determining chitinolytic, proteolytic, lipase and esterase activity, being related to insecticidal activity. About 85 actinomycetes were selected, which tested positive for at least four of the five enzymes evaluated, highlighting CHI strains such as CHI 10, CHI 27, CHI 42, LAR 16, SHA 2, NEV 39, FW 41 having a degradation rate  $>2$  for chitinolytic activity. For proteolytic activity the strains CHI 42, 112, and 123 and LAR 8, presented this activity at 24 h of incubation. On the other hand, for lipase and esterase tests, 85% and 95%, respectively, of the actinomycetes studied were positive for these enzymes. In addition, the antimicrobial activity of 42 actinomycetes was evaluated, which in 37 of them resulted in no inhibitory activity, while the strains CHI 27, 29, 30, 49 and FW 42 had antimicrobial activity against pathogenic microorganisms of interest such as *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *S. enteritidis* and *S. typhimurium*. Analyzing all of the data recovered, it is suggested that these actinomycetes can be used for further testing against *Ae. Aegypti* to evaluate their insecticidal activity and propose them as an alternative for mosquitoes' control.

## 1. INTRODUCCIÓN

Existen diversos vectores capaces de transmitir enfermedades virales de importancia debido a que suelen ser mortales en la salud humana. Los mosquitos son vectores capaces de transmitir enfermedades tales como dengue, fiebre amarilla, malaria, zika, chikungunya, entre otras; todas ellas responsables de alrededor de mas de 25,000 muertes al año (Frantchez et al. 2016). Dentro de las especies de mosquito relevantes se encuentran *Culex pipiens*, *Anopheles gambiae*, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, entre otros, siendo esta última una de las mas importantes al ser capaz de causar tres enfermedades: dengue, zika y chikungunya. Por lo anterior, el control del vector *Ae. aegypti* es de suma importancia con el fin de evitar su propagación, así como el desarrollo de estas enfermedades en diferentes partes del mundo (Basurto-Zambrano 2016). Cabe destacar, que su control se ha dificultado por diferentes razones, entre ellas el rápido desarrollo del vector, ya que, su ciclo dura alrededor de 10 días en las condiciones óptimas, además de los depósitos donde puede desarrollarse que suelen estar de manera usual en viviendas humanas como botellas, floreros, llantas, etc.; facilitando la puesta de huevos una vez que se tienen condiciones ideales de temperatura y alimento (García et al. 2019). Por otro lado, los insecticidas sintéticos, ha sido la estrategia principal para el control de diferentes vectores, sin embargo, a pesar de ser herramientas importantes para el control, su aplicación desencadena una serie de efectos negativos al ser tóxicos para el ser humano y fauna, además contribuye a la contaminación ambiental y afecta cultivos de importancia agrícola, adicional a ello, los vectores como el mosquito han desarrollado resistencia a estos productos, por lo cual, se buscan diferentes alternativas para su control (Kaur et al. 2019). Dentro de la búsqueda de nuevas estrategias esta el desarrollo de bioinsecticidas que tienen mayores ventajas en comparación con los insecticidas sintéticos por ser mucho más específicos y amigables con el medio ambiente; además, se destaca el ingrediente activo al ser principalmente microorganismos como bacterias, hongos, nemátodos, entre otros. El uso de microorganismos tiene múltiples ventajas al producir compuestos bioactivos que pudieran funcionar de manera idónea para el control biológico de diferentes vectores de interés, entre ellos el mosquito (Isah, Raubilu, and Ahmad 2019). Los actinomicetos son un grupo versátil de bacterias y una alternativa viable como modelo

idóneo para implementarlos como agentes de control biológico al ser no solo capaces de degradar materia orgánica debido a la amplia gama de enzimas hidrolíticas que producen (proteasas, quitinasas, celulasas, lipasas, peptidasas, etc.), si no también, tener la capacidad de producir antibióticos y otros componentes de interés industrial (Sharma and Salwan 2018). Los metabolitos secundarios producidos por los actinomicetos muestran una gran variedad estructural además de un amplio rango de actividades antimicrobianas, antitumorales, antiparasitarias, antivirales y algunos han demostrado también tener actividad insecticida; esto los coloca como candidatos potenciales para el control de vectores, además, al estar ampliamente distribuidos en ambientes terrestres y acuáticos, los hacen relativamente de fácil acceso. Sin embargo, un punto importante a destacar es que los actinomicetos tiene su acción efectiva debido a la combinación de productos bioactivos y enzimas como quitinasa, proteasa y lipasa, que son capaces que provocar efectos directos en el desarrollo del mosquito degradando la superficie del insecto o causando retraso en el desarrollo de algún instar del vector, por lo cual, los actinomicetos podrían ser más efectivos en el control de diferentes vectores al utilizar una gran variedad de compuestos que actúan tanto en conjunto como de forma específica dándoles una mayor potencialidad en el control de vectores en comparación con otros microorganismos (Krzesniak et al. 2018). Además, cabe destacar, que la biosíntesis de estos compuestos es realizada en su mayoría por el gen tipo I del policétido sintasa (PKS I), al ser el que sintetiza una gran variedad de policétidos, poliéteres, macrólidos, avermectinas, entre otros compuestos que han demostrado tener diferentes actividades biológicas, incluyendo actividades con efectos insecticidas (Risidian, Mozef, and Wink 2019). Debido a lo anterior, se busca realizar una selección adecuada de actinomicetos aislados de diferentes ecosistemas teniendo en cuenta la producción de enzimas de interés y la presencia del gen PKS, con el fin de evaluar su potencial insecticida para el posible desarrollo de un bioinsecticida contra *Ae. aegypti*.

## 2. ANTECEDENTES

En la actualidad, algunas de las enfermedades conocidas de índole mundial que resultan ser mortales son causadas por vectores; siendo los artrópodos uno de los mas importantes debido a que tienen la capacidad de albergar un agente infeccioso, capaz de desarrollarse dentro del mismo y transmitirlo a otros causando daños que pueden resultar letales. Esta letalidad es debida a que la mayoría de estos al ser insectos hematófagos son capaces de ingerir microorganismos patógenos provenientes de la sangre de un portador infectado y a su vez logran infectar al humano generándole una serie de problemas que podrían terminar con la vida de este. Cabe destacar que las enfermedades infecciosas de este tipo cubren al menos el 17% de las causas de muerte al año, es por ello la importancia de su control. A finales del siglo XIX se presentaron brotes importantes en África, lo que originó un mayor interés pues hubo una diseminación importante de la enfermedad a nivel mundial, identificando a los vectores responsables, *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*, siendo este último el responsable del 99% de los casos reportados de dengue a nivel mundial (Ahmad et al. 2017).

### 2.1 Descripción de *Ae. aegypti*

Son insectos considerados holometábolos al presentar en su ciclo de vida la formación de huevos, cuatro estadios larvales así como un estadio pupal e imago. En este sentido, la hembra una vez que madura sexualmente es capaz de colocar entre 20 y 120 huevos en diferentes tipos de contenedores de agua. Asimismo, el desarrollo embrionario transcurre en un periodo de 48 horas, esto sucede si el huevo tiene las condiciones idóneas ello como humedad y temperatura. Cabe destacar que aun en condiciones no adecuadas el embrión puede sobrevivir varios meses y poder reiniciar su desarrollo hasta el estadio larval cuando se encuentre ya en condiciones óptimas (Reinhold, Lazzari, and Lahondère 2018). Es importante destacar que el tamaño de la hembra esta altamente relacionado con la capacidad que tienen para transmitir los diferentes virus que estos son capaces de albergar como el virus del dengue, zika o chikungunya, entre otros; y esto es debido a que al ser mas grandes pueden ingerir un mayor volumen de sangre por picadura y a su vez, su longevidad puede ser mayor, lo cual, favorece la transmisión del virus (Anoopkumar et

al. 2017). Por todo lo anterior, es de suma importancia conocer su desarrollo para proponer alternativas para su control.

## **2.2 Situación mundial**

Dentro de las enfermedades que mayor mortalidad presentan a nivel mundial se encuentran aquellas transmitidas por la picadura de insectos, principalmente mosquito. Actualmente, en 120 países alrededor del mundo son afectados por este tipo de enfermedades, tanto en zonas urbanas como rurales. Se estima que al año mas de 390 millones de personas son hospitalizadas por causas de dengue hemorrágico, de estos, 96 millones son sintomáticas además de provocar 500,000 hospitalizaciones, además cabe recalcar que el 2.5% de estos resultan en fallecimientos a causa de complicaciones durante la enfermedad (Escobar et al. 2019).

*Ae. aegypti* es endémico en países como África, Asia, India, Pakistán y cabe destacar que su incidencia se ha visto en aumento debido a diferentes causas como crecimiento de la población, urbanización incontrolada, deficientes sistemas de control de higiene, aumento de viajes en avión, camiones, barcos, etc. Además, en Latinoamérica se han registrado casos en países como Bolivia, Brasil, Colombia, Perú, México, entre muchos otros; incrementando su incidencia año con año. En el 2010, se registraron alrededor de 1.6 millones de casos, de los cuales murieron mas de 1000 personas. En la actualidad, mas del 75% de los casos de dengue son desarrollados en Asia registrándose más de 30,000 casos por año en esta zona (Basurto-Zambrano 2016). A diferencia de los países donde es endémica la enfermedad, en otros como aquellos localizados en Europa, su incidencia es clasificada como de importación pues su transmisión es debida a personas que regresan de África, Caribe, Latinoamérica, principalmente. Sin embargo, en la actualidad siguen en la lucha con medidas de control adecuadas para poder erradicar por completo al mosquito causante del dengue y otras enfermedades como zika, chikungunya, etc (Powell, Gloria-Soria, and Kotsakiozi 2018).

## **2.3 Situación en México**

Durante décadas, las dos modalidades de enfermedad del dengue: fiebre por dengue y fiebre hemorrágica del dengue, afectaban principalmente a adultos en edad reproductiva,



sin embargo, en la actualidad se ha visto que afectan también a la población infantil, lo cual ha preocupado más a las diferentes organizaciones de salud. En México, en los últimos 10 años se ha visto este cambio donde anteriormente la prevalencia era más en adultos y ahora los casos registrados han sido en población infantil y juvenil (Barragán et al. 2016). Además, durante el paso de los años se ha tenido menos control debido a que los cuatro serotipos del dengue se han establecido en el país mexicano: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, respectivamente. La razón por la cual se establecieron estos serotipos se debe a la cercanía con el trópico, clima idóneo para el desarrollo y crecimiento óptimo del mosquito, permitiendo su circulación de manera periódica. En 1978, fue la reintroducción de esta enfermedad, la cual; había sido erradicada por más de 12 años. En 1980 hasta el 2011, se registraron tres períodos con al menos un brote importante de dengue por periodo (Danis-Lozano et al. 2019). Cabe destacar, que en 9 estados hubo una mayor incidencia de fiebre del dengue y fiebre hemorrágica del dengue, donde la población más afectada fue la infantil seguido de la juvenil. El mayor número de casos se presentaron en Colima, Guerrero, Michoacán y Oaxaca, siendo uno de los principales factores condicionantes la deficiencia en los servicios básicos de salud (Galicia, Poza, and Becker 2015). De igual forma, los factores ambientales han impactado en la prevalencia y remergencia del dengue (variabilidad climática), provocando que las medidas para el control del vector no sean del todo eficientes; a ello debe añadirse la urbanización poco planeada en regiones donde hay una elevada concentración de mosquitos. Cabe destacar que estas grandes poblaciones de mosquito se establecen de manera rápida debido a que como hay servicios deficientes, la gente suele almacenar el agua en depósitos cercanos a sus viviendas lo que ayuda a que estos sirvan como un lugar idóneo para el crecimiento y reproducción de poblaciones de diversos vectores, entre ellos, el mosquito, el cual solo necesita de cuerpos de agua con flujo lento para depositar sus huevos (Lubinda et al. 2019).

## **2.4 Situación en Nuevo León**

El estado de Nuevo León ha sido estudiado detalladamente en términos de taxonomía y distribución de mosquitos, ya que la aparición de casos de enfermedades provocados por este vector datan desde 1998, donde se portaron por primera vez alrededor de mas de 2070

casos en la área metropolitana del estado. Actualmente, en casi todos los municipios de Nuevo León se han reportado casos por dengue, principalmente en Apodaca con 136 casos, seguido por Monterrey, Guadalupe, San Nicolás de los Garza, General Escobedo con 107, 104, 72 y 62, respectivamente (Ortega-Morales et al. 2019). En estos municipios las causas mas comunes que provocan una mayor incidencia se deben a un crecimiento constante de la población, así como, construcciones irregulares que genera ambientes idóneos para la distribución y crecimiento del vector (mosquito). Por otro lado, de los casos reportados en Nuevo León se confirmaron alrededor de 645 casos de los cuales el 8.36% fue hemorrágico, sin embargo, no se reportaron muertes. Los serotipos que se encuentran comúnmente en Nuevo León son el DEN-V1 y DEN-V2, respectivamente. Cabe destacar, que en áreas industriales, zonas residenciales o quintas que no son habitadas de manera periódica, no se detecto ningún brote (López and Alatorre 2019). Finalmente, los métodos de control actuales no han sido del todo eficaces lo cual genera que se busquen medidas pertinentes como métodos de control para evitar la dispersión del mosquito.

## **2.5 Métodos de Control**

Debido a que la presencia del vector se ha incrementado año con año, se han generado múltiples estrategias para tener un control adecuado del mosquito causante del dengue, zika, chikungunya, entre otras; desde análisis de la dinámica del vector (distribución y comportamiento), así como estudios toxicológicos usando diferentes tipos de insecticidas hasta estudios de vanguardia (análisis genómicos y proteómicos), que permitan alternativas viables ya sea para reducción de la propagación del mosquito así como la generación de vacunas contra los diferentes serotipo. Además, hoy en día, los programas de control que siguen vigentes tanto en comunidades privadas, locales y públicas son combatir estas plagas mediante componentes químicos y control biológico (Weeratunga et al. 2017).

## **2.6 Control Químico**

Este es uno de los métodos más utilizados en todo el mundo para el control de diferentes tipos de vectores. Consiste en un amplio grupo toxicológico tales como organofosforados,

carbamatos, piretroides, reguladores de crecimiento, entre otros. Estos compuestos garantizan efectos positivos en cuanto al control de los vectores, sin embargo; presentan una seria desventaja y es la generación de resistencia por parte de los mosquitos a las dosis empleadas para su control (Galavíz-Parada et al. 2016). Por lo anterior, se ha cuestionado su uso por los diferentes tipos de resistencia que tanto *Ae. aegypti* como otros vectores de importancia han generado. Se cree que la resistencia generada a los diferentes insecticidas químicos no solo es debida al uso indiscriminado de estos, si no también a factores bióticos como la bioquímica, genética, fisiología y ecología que dependen de cada especie y su población. Adicional a esto, es el alto costo que representa generar los formulados y la alta concentración que se aplica, lo que trae como consecuencia contaminación al ambiente y cultivos agrícolas, si no se siguen las medidas pertinentes de aplicación (Noskov et al. 2019).

## **2.7 Control Biológico**

Esta es otra de las alternativas utilizadas para sustituir la aplicación de componentes químicos para el control de vectores, en esta estrategia se utilizan agentes entomopatógenos en donde podemos englobar cinco grupos importantes que van desde bacterias, nemátodos, protozoarios, virus y hongos. Las bacterias más utilizadas para el control de mosquitos son *Bacillus thuringiensis israelensis* y *Bacillus sphaericus*, las cuales ayudan a reducir las poblaciones de mosquito. Actualmente, aquellas plantas que expresan las proteínas cry, provenientes de *Bacillus thuringiensis* (Bt), han dado como resultado que las plagas comiencen a generar resistencia a estas proteínas, invasividad potencial y el riesgo de polinización cruzada entre los cultivos Bt y cultivos no modificados. El uso de este tipo de control se ha cuestionado por el riesgo latente de que existe la posibilidad de perder biodiversidad donde los enemigos naturales de las plagas pueden ser afectadas (Paulraj et al. 2016). Por otro lado, hay varios virus que afectan al mosquito como los densovirus, el causante de poliedrosis citoplásmica, entre otros; pero no se han podido generar formulaciones comerciales que permitan su aplicación en campo. Estrategias tales como el uso de predadores naturales (invertebrados, peces, ranas, patos, entre otros), no se utilizan como programas de control debido a su difícil manejo para aplicarlo en casas, habitaciones, etc. Es por ello, que se ha intensificado la búsqueda

de otros métodos de control que sean eficaces y amigables para el medio ambiente además de tener costos bajos (Y.-J. S. Huang, Higgs, and Vanlandingham 2017).

## **2.8 Nuevas Alternativas**

En la actualidad, se ha buscado generar bioinsecticidas para diferentes vectores de importancia, como lo es el mosquito *Ae. aegypti*, ya que son capaces de provocar enfermedades que afectan al ser humano. El uso repetido de insecticidas sintéticos para el control de poblaciones de mosquito ha causado discrepancias en sistemas de control biológico lo que ha resultado en la reemergencia del vector, así como el desarrollo de resistencia en los mismos, lo que ocasiona que sea más difícil su control. Una de las alternativas más prometedoras es el uso de bioinsecticidas que a pesar de ser de acción lenta puede ser efectivo, económico, efecto duradero e inofensivo para el ecosistema y para los seres humanos (Janardhan et al. 2018). Para la generación de estos se utilizan hongos, virus, nemátodos y bacterias, donde en estas últimas se encuentra un grupo llamado actinomicetos. Estas bacterias son productores de metabolitos secundarios que pueden conferir capacidad antimicrobiana, antiparasitaria, antiviral, antifúngica y finalmente insecticida. Una de las principales ventajas del uso de estos microorganismos es que están ampliamente distribuidos en suelo y son benéficos para algunos insectos ya que los pueden proteger de otros patógenos microbianos y depredadores (Hamadah 2018). Además se ha señalado la actividad insecticida de los actinomicetos contra insectos patógenos como *Plutella xylostella*, *Aphis glycines* y *Culex pipens*, por lo cual, se propone como alternativa para evaluarlo contra *Ae. aegypti*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La creciente demanda en la falta de medidas de control de este vector en los últimos años ha provocado el aumento de casos de enfermedades causadas por mosquito, lo que ha generado un interés por implementar nuevas alternativas para el control de *Ae. aegypti*. En México, se encuentran los cuatro serotipos característicos del dengue. El comportamiento de la enfermedad muestra un perfil irregular, ya que hay un aumento o una disminución en los casos reportados, lo que nos indica que los sistemas de prevención actuales no son del todo eficaces. Los principales sistemas de control utilizados son insecticidas químicos, sin embargo, la efectividad es menor ya que los insectos o el mosquito han adquirido resistencia a estos; adicional a su efecto contaminante lo que los hace una alternativa poco amigable con el ambiente.

Los insecticidas químicos de última generación presentan como principio activo los piretroides, indoxacarb, piriproxifen, principalmente. Tienen baja toxicidad para mamíferos, son menos dañinos a insectos benéficos, sin embargo, algunos pueden ser tóxicos para peces y otros invertebrados. Lo anterior, plantea la necesidad de generar nuevas estrategias que sean más amigables con el medio ambiente, seres humanos y con las diferentes especies que habitan en el ecosistema. Una estrategia es el uso de bioinsecticidas donde el principio activo será de origen biológico (bacterias, hongos, nemátodos, virus, actinomicetos, entre otros), que se ha determinado que presentan actividad insecticida contra algunos vectores. Los actinomicetos son microorganismos que pueden ser herramientas potenciales para el control de vectores de importancia como los mosquitos. Estos, además de producir diferentes tipos de enzimas, son capaces de producir una amplia gama de metabolitos secundarios con actividades biológicas que se pueden utilizar para controlar a estos vectores. Por lo cual, debido a las características y posibles ventajas que estos microorganismos poseen se proponen como alternativa de control biológico contra *Ae. aegypti*.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las cepas de actinomicetos nativos de diferentes ecosistemas (terrestres y acuáticos) CHI, LAR, SHA, NEV y FW son capaces de producir compuestos bioactivos, como enzimas hidrolíticas y actividad antimicrobiana, además de contar con la presencia del gen PKS que está relacionado con la actividad larvicida de éstos; por lo tanto, pueden considerados como posibles agentes de biocontrol contra *Ae. aegypti*.

## **5. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

1. Evaluar la capacidad insecticida de las de cepas de actinomicetos nativos CHI, LAR, SHA, NEV y FW proporcionados por el cepario del Laboratorio 8 del Instituto de Biotecnología.

### **Objetivos Particulares**

1. Caracterizar enzimáticamente las cepas CHI, LAR, SHA, NEV y FW (actividad quitinasa, proteasa, lipasa, y esterasa, principalmente).
2. Evaluar actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas de interés.
3. Extracción de DNA de actinomicetos con mayor actividad enzimática.
4. Evaluar la presencia del gen PKS en los actinomicetos seleccionados.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Microorganismos**

Los microorganismos fueron proporcionados a partir de una colección existente en el Laboratorio 8 del Instituto de Biotecnología (FCB/UANL). Dichos microorganismos eran provenientes de diferentes regiones [CHI (Chiapas, México), LAR (Lago de Arareco, Chihuahua), SHA (Sahara, África), NEV (Nevada, E.U.A) y FW (Forty Whyte, Canadá)].

### **6.2 Aislamiento y activación de actinomicetos**

La activación y aislamiento de los actinomicetos se llevó a cabo en agar avena (1 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 1.5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/L  $\text{NaNO}_3$ , 10g/L Avena, 18 g/L agar bacteriológico). Posterior a la prueba de esterilidad a la que fueron sometidas las placas petri con agar, estas fueron inoculadas con 20  $\mu\text{L}$  del criovial y se sembraron en forma de tamiz. El período de incubación fue de 5 a 7 días a 30 °C (Jiang et al. 2016).

### **6.3 Evaluación de actividad quitinasa**

Se preparó agar quitina (2 g/ 100 mL quitina coloidal, 0.2 g/100 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 g/ 100 mL  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01 g/ 100 mL  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/ 100 mL agar bacteriológico). Se esterilizó a 15 lb por 15 minutos (Bouthina et al. 2015). Posterior a ello, se realizó el corte de fragmentos de 5 mm de los tamizajes realizados con ayuda de pipetas pasteur de vidrio. Las placas de quitina se dividieron en doce recuadros. Un fragmento de cada cepa fue colocado de manera que el actinomiceto se encontrará en contacto directo con el agar. El período de incubación fue de 10 días a 30°C, donde se midió el halo de inhibición de aquellos actinomicetos que presentaban dicha actividad.

### **6.4 Evaluación de actividad proteasa**

Se preparó agar leche (2 Frascos: Frasco A: 100 g/L Leche descremada 10%, 500 mL agua destilada, sus condiciones de esterilización fueron a 10 Lb por 10 minutos. Frasco B: 1 g/L peptona 0.1%, 5 g/L  $\text{NaCl}$  0.5%, 20 g/L agar bacteriológico, 500 mL agua bidestilada), se esterilizó a 15 lb por 15 min (Alnahdi 2012). La placa de agar leche se dividió en ocho partes donde se sembraron los actinomicetos por estría simple. El tiempo de incubación



para dicha prueba fue de seis días, donde se registraron como positivos cuando se observaba una degradación en el medio por parte del actinomiceto.

### **6.5 Evaluación de actividad lipasa**

Se realizó un stock de rojo de fenol (0.02 g de colorante rojo de fenol diluidos en 2.84 mL de NaOH al 0.02N y aforados a 50 ml), por último se llevó a cabo su esterilización por filtración. Posteriormente se preparó el agar rojo de fenol (0.5g CaCl<sub>2</sub>, 0.5g Aceite de oliva estéril, 1g Agar bacteriológico, 50 mL agua bidestilada).

Nota:\*Se pesaron componentes para 50 mL pero se agregaron 37.5 ml de agua debido a que el resto se completó con 12.5 ml de colorante de rojo de fenol\*

Se dividieron las placas de agar rojo de fenol en doce recuadros donde se colocaron fragmentos de 5 mm directamente sobre el agar. El tiempo de incubación fue de siete días a 30°C, donde se tomó como resultado positivo todo aquel donde mostrará un cambio de viraje en el medio de rojo a amarillo.

### **6.6 Evaluación de actividad esterasa**

Se preparó agar Tween 20 y 80 (1g Peptona, 0.5 g NaCl<sub>2</sub>, 0.013g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 2g Agar bacteriológico, 1mL Tween 20 y 80, 100 mL agua bidestilada) y se esterilizó a 15 lb por 15 min. Se dividieron las placas de agar Tween 20 y 80 en 12 recuadros colocándose fragmentos de 5 mm directamente sobre el agar. El período de incubación fue de siete días a 30°C, donde se registró como resultado positivo todos aquellos que presentaban una precipitación de sales en el medio.

### **6.7 Determinación de actividad antimicrobiana**

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los actinomicetos pertenecientes a Chiapas, así como una proveniente de Canadá.

Bacterias patógenas y deteriorantes: se emplearon los siguientes organismos: *Klebsiella pneumoniae* ATCC (Aislado clínico), *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Las cepas se reactivaron en agar nutritivo y se incubaron a 37°C por 24 h. Posteriormente se inoculó

con una asada de cada bacteria caldo nutritivo y se incubó a la misma temperatura por 18 h.

La determinación de actividad fue por el método de doble capa: se sembraron los actinomicetos en placas de agar Mueller-Hinton (Extracto de carne 2g, peptona 17.5g, almidón 1.5g, agar bacteriológico 17g, y se ajustó pH 7.4  $\pm$ 0.1), tomando una asada y haciendo un círculo pequeño. Se incubaron por espacio de 4 días a 30°C. 18 h antes de transcurrido el tiempo de incubación de los actinomicetos se inocularon los tubos con cada una de las bacterias previamente mencionadas. A las 18 h y con una absorbancia de 0.25 (aprox.,  $2.0 \times 10^8$  cel/mL), se agregó 1 mL en 99 mL de agar Mueller-Hinton y se vertió 10 mL en doble capa a las placas con los actinomicetos. Posterior a su solidificación, se incubaron por 24 h a 37°C. Se evaluó la inhibición de las bacterias por los actinomicetos estudiados, donde se midieron los halos de inhibición (cm).

## **6.8 Extracción y purificación de ADN**

Se transfirió una sola colonia a un tubo eppendorf estéril con 54  $\mu$ l Tris (10 mM), EDTA (1 mM, pH 8.0) con la puntilla estéril de una pipeta; después, se agregaron 6  $\mu$ l de una solución 0.4 M de KOH y 10 mM EDTA que fueron añadidos al tubo y se llevó a una incubación de 70°C durante 5 min y posteriormente, se incubó a 90°C por 5 min. Se agregaron 6  $\mu$ l Tris HCl (pH 4.0) al lisado para ajustar el pH. Este último se utilizó directamente como templado de ADN para su posterior amplificación por PCR. El ADN fue almacenado a -20°C. La composición del buffer de lisis, el tiempo de lisis y la temperatura fueron optimizados (Sun et al. 2014).

## **6.9 Detección del gen PKS**

Se realizó la detección del gen *PKS* de los diferentes actinomicetos proporcionados por el Laboratorio 8. Se llevó a cabo una PCR, los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: 540F, 5'-GGITGCACSTCIGGIMTSGAC-3' and 1100R, 5'-CGATSGCICCSAGIGAGTG-3', los cuales son específicos para el gen *PKS*. Las reacciones de amplificación para la PCR fueron realizadas en un volumen total de 15  $\mu$ l. Cada reacción contenía las siguientes soluciones: 1.5  $\mu$ l DNA genómico, 1  $\mu$ l de 9mM de oligonucleótido forward (5'-GGITGCACSTCIGGIMTSGAC-3'), 1  $\mu$ l de 9 mM de

oligonucleótido reverse (5'-CGATSGCICCSAGIGAGTG-3'), 0.5 µl de 6 mM dNTP's, 1.5 µl de Taq 10X Buffer, 0.2 µl de Taq polymerase (5 U) y finalmente 9.3 µl de agua miliQ. Las condiciones utilizadas para el termociclador (Techne TC-5000) fueron las siguientes: desnaturalización inicial 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, alineamiento a 57°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto y 30 segundos y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. El producto de PCR amplificado fue analizado en un gel de electroforesis de agarosa al 0.7% utilizando buffer TAE 1X, teñido con GelRed (GelRed™ Nucleid Acid Gel Stain, 10,000X; Biotium). Las condiciones de corrida del gel de agarosa fueron de 70V durante 1 hora 30 minutos. Los patrones de DNA fueron examinados y analizados mediante luz UV en un documentador (MultiDoc-It Digital Imaging System by UVP).

## 7. RESULTADOS

En el presente trabajo se llevó acabo la inoculación de 180 actinomicetos de diferentes regiones (Tabla 1) en agar avena y se analizó la morfología macroscópica de cada uno de ellos, donde destacaban los colores opacos, lo cual es característico de estos microorganismos (Figura 1).

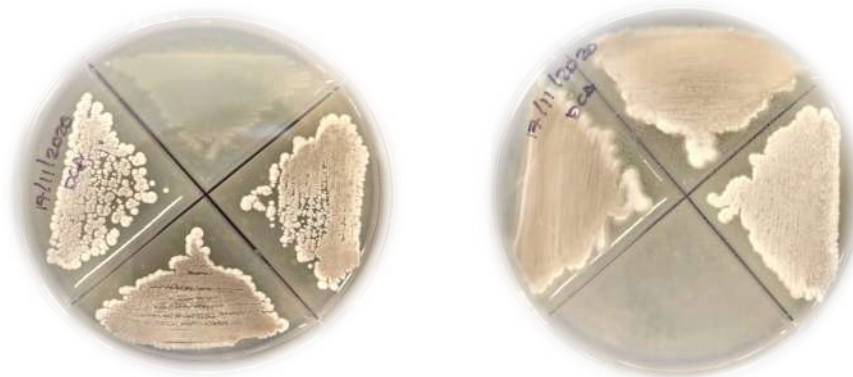
**Tabla 1. Origen y tipo de muestra de actinomicetos nativos.**

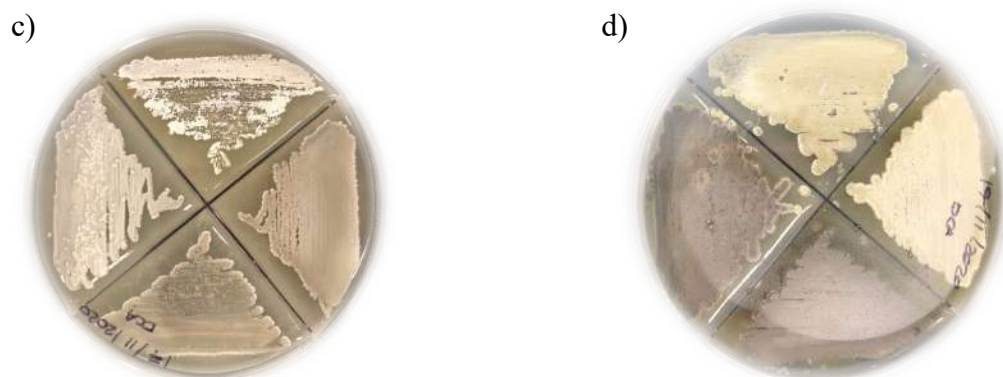
Nombre de cepa	Origen	Tipo de muestra
<b>CHI</b>	Chiapas, México	Suelo
<b>LAR</b>	Lago de Arareco, Chihuahua	Lago
<b>SHA</b>	Sahara, África	Suelo
<b>NEV</b>	Nevada, E.U.A	Lago
<b>FW</b>	Forty Whyte, Canadá	Suelo

a)



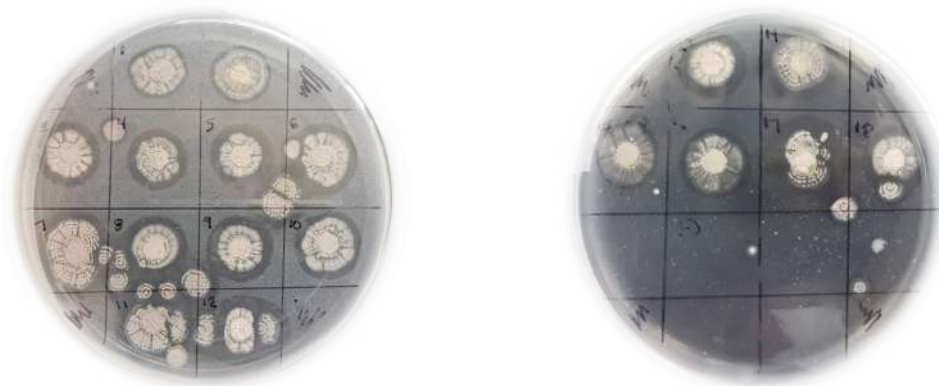
b)





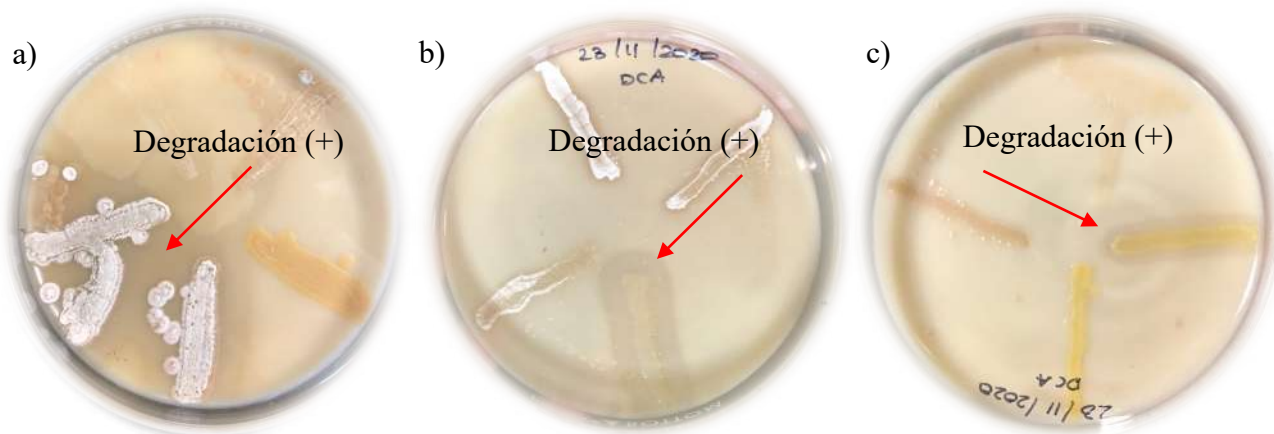
**Figura 1.** Aislamiento en agar avena de actinomicetos nativos provenientes de Chiapas, México (a), Lago Arareco, Chihuahua (b), Sahara, África (c) y Forty Whyte, Canadá (d).

Posterior a ello, se realizaron diferentes pruebas para su caracterización enzimática (quitinasa, proteasa, lipasa y esterasa), de las cuales se seleccionaron 85 cepas que fueron las que dieron mejor actividad en las diferentes pruebas. En el caso de quitinasa, la cual se realizó en agar quitina inoculando fragmentos de 5mm en contacto directo con el agar, para poder observar halos de degradación, lo cual significa un resultado positivo a dicha prueba (Figura 2). Adicional a ello, se determinó el índice de degradación, lo cual permite seleccionar aquellas cepas que presenten un valor igual o superior a 2.0, pues este valor indica que estos microorganismos son buenos productores de este tipo de enzima hidrolítica. Las cepas con mayor índice fueron CHI 10, CHI 27, CHI 42, LAR 16, SHA 2, NEV 39, FW 41 (Tabla 2).



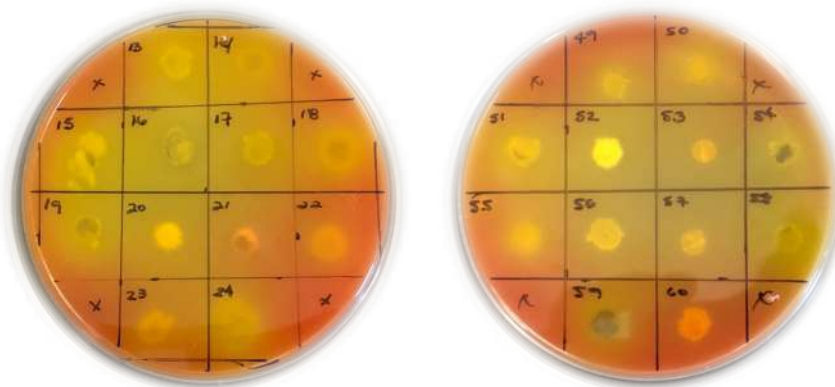
**Figura 2.** Actividad enzimática de quitinasa en agar quitina. Se evaluó su crecimiento y halos de degradación de los diferentes actinomicetos.

Para la determinación de la enzima proteasa, se utilizó agar leche en el cuál se determinó un resultado positivo si en este se presentaba una degradación del medio, dando como indicio la producción de esta enzima (Figura 3).



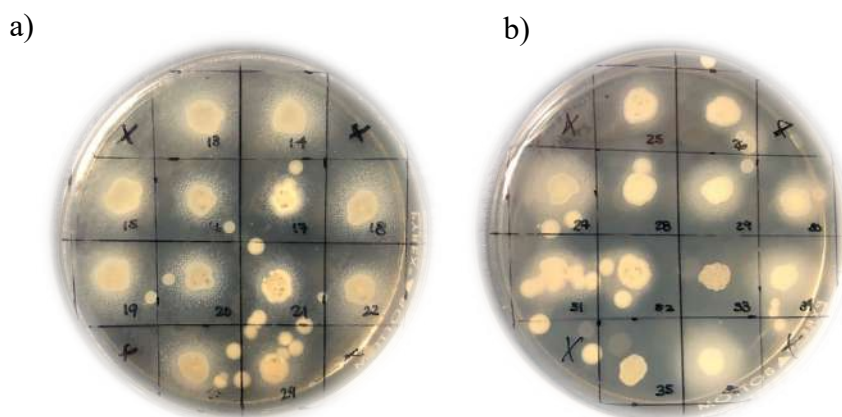
**Figura 3.** Actividad enzimática de proteasa en agar leche, donde se puede observar claramente un resultado positivo debido a la degradación del sustrato por parte del actinomiceto.

Los resultados de la actividad lipasa (agar rojo de fenol), cuya positividad se determinó mediante la observación de un cambio en el color de rojo a amarillo, debido a la liberación de ácidos grasos por la reacción de las enzimas lipolíticas producidas por los actinomicetos evaluados. Del total de cepas evaluadas (85), el 85% (72), fueron positivas a esta prueba (Figura 4).



**Figura 4.** Actividad enzimática de lipasa en agar rojo, donde se observa un cambio de color en el medio de rojo a amarillo.

Por último y con el fin de evaluar la actividad esterasa de los actinomicetos, se pusieron en contacto en agar Tween 20 y Tween 80. La prueba se consideró positiva si se observaba la presencia de precipitado alrededor de las colonias y esto debido a las sales de calcio que contiene el medio. De las 85 cepas evaluadas, 80 (95%), dieron positivo (Figura 5).



**Figura 5.** Actividad enzimática de esterasa en agar Tween 20 (a) y Tween 80 (b), donde se observa la precipitación de sales de calcio del medio.

Finalmente, de los 180 actinomicetos de las diferentes regiones evaluadas, se seleccionaron 85 actinomicetos, en los cuales se basó su selección en que dichos microorganismos fueran positivos en al menos cuatro de las cinco pruebas realizadas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Actividad enzimática de actinomicetos aislados en las diferentes pruebas.

<i>CEPA</i>	QUITINASA (promedio±ds) cm	PROTEASA	LIPASA	ESTERASA	
				TWEEN 20	TWEEN 80
<i>CHI 2</i>	1.9±0.05	—	+	+	+
<i>CHI 9</i>	2.1±0.129	+	+	+	+
<i>CHI 10</i>	2.03±0.05	+	+	+	+
<i>CHI 27</i>	2.08±0.05	—	—	—	—
<i>CHI 28</i>	1.48±0.05	—	+	+	+

<i>CHI 29</i>	2.3±0	—	—	+	+
<i>CHI 30</i>	1.4±0.057	—	—	+	+
<i>CHI 35</i>	2±0	+	+	+	+
<i>CHI 40</i>	1.9±0.18	+	+	+	+
<i>CHI 42</i>	2.48±0.05	+	+	+	+
<i>CHI 43</i>	2.05±0.057	+	+	+	+
<i>CHI 45</i>	1.77±0.05	—	—	+	+
<i>CHI 46</i>	1.55±0.1	+	—	+	+
<i>CHI 47</i>	1.92±0.05	+	+	+	—
<i>CHI 48</i>	2.02±0.05	+	+	+	+
<i>CHI 49</i>	2.6±0.05	—	+	+	+
<i>CHI 52</i>	2.3±0.05	—	+	+	+
<i>CHI 54</i>	2.2±0	+	+	+	+
<i>CHI 55</i>	1.8±0.09	—	+	—	—
<i>CHI 57</i>	1.8±0.05	—	+	+	—
<i>CHI 60</i>	1.72±0.05	+	+	+	+
<i>CHI 61</i>	1.7±0.05	+	—	+	+
<i>CHI 63</i>	2.1±0.05	+	+	+	+
<i>CHI 85</i>	1.3±0.05	—	+	—	—
<i>CHI 91</i>	1.6±0	—	+	+	+
<i>CHI 95</i>	1.5±0	—	+	—	+
<i>CHI 104</i>	1.7±0	+	+	+	+
<i>CHI 105</i>	2.3±0.05	—	+	+	+
<i>CHI 106</i>	2±0	+	—	—	—
<i>CHI 108</i>	2.4±0.05	+	+	+	+
<i>CHI 112</i>	1.7±0.05	+	+	+	+
<i>CHI 118</i>	1.8±0	—	—	+	+
<i>CHI 119</i>	1.3±0.05	—	+	—	—
<i>CHI 123</i>	1.3±0.05	+	+	+	+
<i>CHI 126</i>	1.1±0	—	+	—	—

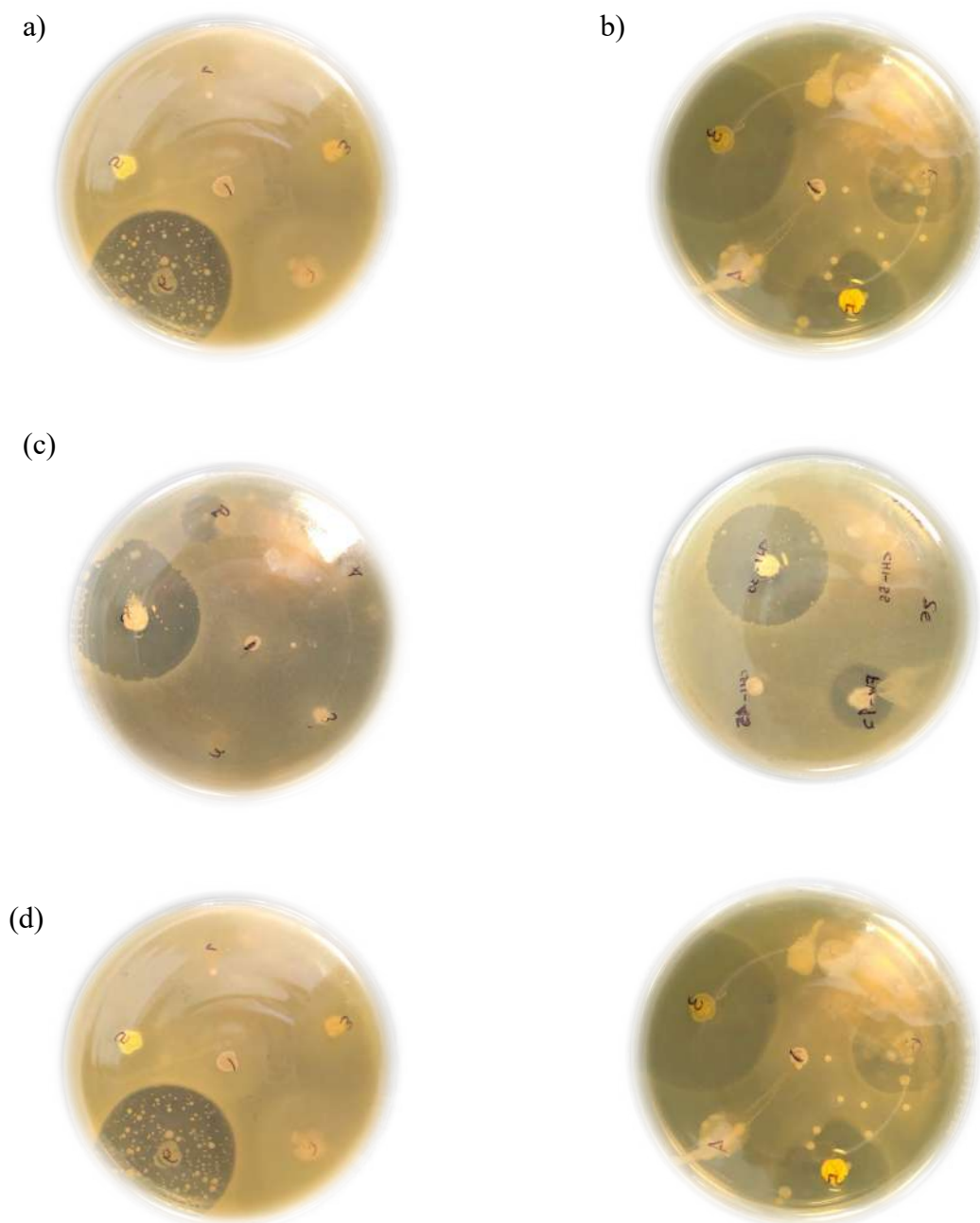


<i>CHI 129</i>	1.4±0	—	—	+	+
<i>CHI 134</i>	1.3±0.05	—	—	+	+
<i>CHI 139</i>	2.±0.05	+	+	+	+
<i>CHI 140</i>	1.55±0.057	+	+	+	+
<i>CHI 141</i>	1.95±0.17	+	+	+	+
<i>CHI 142</i>	2.07±0.09	+	+	—	+
<i>CHI 143</i>	1.8±0.15	+	+	+	+
<i>CHI 144</i>	2.15±0.17	+	+	+	+
<i>CHI 146</i>	1.55±0.058	+	—	+	+
<i>CHI 147</i>	1.12±0.15	—	—	—	—
<i>CHI 148</i>	2.25±0.12	+	+	+	+
<i>CHI 150</i>	2±0.08	+	+	+	+
<i>CHI 152</i>	2±0	+	+	+	+
<i>CHI 153</i>	1.85±0.05	+	—	+	+
<i>CHI 157</i>	1.8±0	—	+	+	+
<i>LAR 2</i>	0.7±0.05	+	+	+	+
<i>LAR 3</i>	1.3±0	—	+	—	+
<i>LAR 4</i>	1.5±0.05	+	+	—	—
<i>LAR 5</i>	1.8±0.05	—	+	—	+
<i>LAR 6</i>	1.3±0.05	+	+	+	—
<i>LAR 7</i>	1.3±0	—	+	+	+
<i>LAR 8</i>	1.5±0	—	+	+	—
<i>LAR 12</i>	0±0	+	+	+	—
<i>LAR 13</i>	1.4±0.05	+	+	—	—
<i>LAR 15</i>	1.3±0	—	+	+	—
<i>LAR 16</i>	2±0	+	+	—	—
<i>LAR 17</i>	1.55±0.05	—	+	+	+
<i>LAR 19</i>	1.4±0	—	+	+	—
<i>LAR 20</i>	1±0	+	+	+	—
<i>LAR 22</i>	0.8±0.09	+	+	+	+

<i>LAR 25</i>	1.2±0.09	+	+	+	+
<i>LAR 31</i>	1.5±0.05	+	+	+	+
<i>LAR 39</i>	1.3±0.05	–	+	+	+
<i>LAR 40</i>	1.2±0.09	+	+	+	+
<i>LAR 45</i>	1.7±0	+	–	+	+
<i>LAR 48</i>	2±0.08	+	+	+	+
<i>LAR 49</i>	1.65±0.05	–	–	+	+
<i>LAR 57</i>	1.52±0.09	–	+	+	+
<i>SHA 1</i>	2±0	–	+	–	+
<i>SHA 2</i>	2.3±0	+	+	+	–
<i>SHA 13</i>	2±0.05	–	+	+	+
<i>SHA 15</i>	2±0	–	–	–	–
<i>SHA 16</i>	1.52±0.09	–	–	+	+
<i>SHA 17</i>	1.7±0.05	–	+	+	+
<i>NEV 11</i>	2.1±0	+	–	–	–
<i>NEV 39</i>	2.75±0.05	–	–	+	+
<i>NEV 41</i>	1.75±0.05	–	–	+	+
<i>NEV 47</i>	1±0	+	–	–	–
<i>FW 41</i>	2.32±0.05	+	+	+	+
<i>FW 42</i>	2±0	–	+	+	+

CHI (Chiapas, México), SHA (Sahara, África), FW (Fort Whyte, Canadá), LAR (Lago Arareco, Chihuahua), NEV (Nevada, EUA), (–) Prueba Negativa, (+) Prueba Positiva, cm (Centímetros), ds (Desviación estándar).

De 85 actinomicetos que presentaron las cuatro enzimas hidrolíticas evaluadas, se probaron 42 actinomicetos para evaluar su actividad antimicrobiana. De estos, 4 tuvieron un efecto inhibitorio contra *S. aureus*, *S. enteritidis*, *S. Typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae* (Figura 6). El actinomiceto que presentó la mayor inhibición fue CHI 30 con 3.35 cm contra *S. aureus* (Tabla 3).



**Figura 6.** Actividad antimicrobiana de actinomicetos contra *Klebsiella pneumoniae* (a), *S. aureus* (b), *S. enteritidis* (c) y *S. Typhimurium* (d).

**Tabla 3. Inhibición de bacterias patógenas por actinomicetos nativos.**

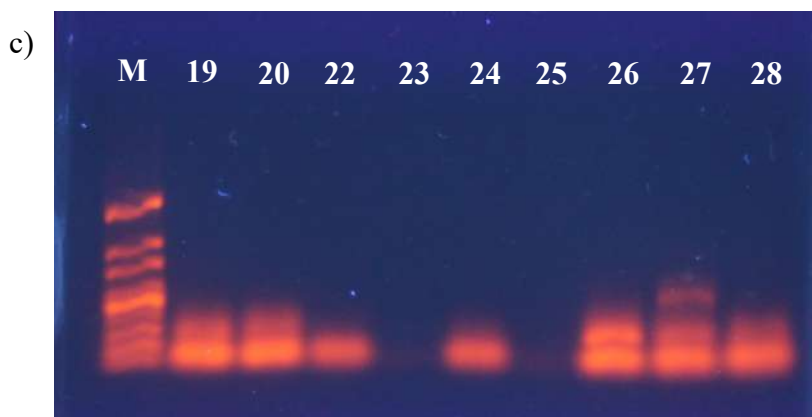
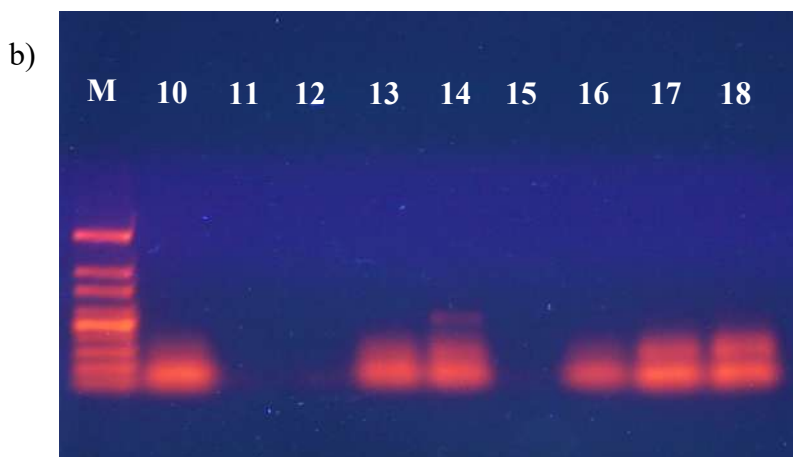
CEPA	Bacterias patógenas (promedio $\pm$ ds) cm			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
CHI 2	—	—	—	—
CHI 9	—	—	—	—
CHI 10	—	—	—	—
CHI 27	—	3.35	—	—
CHI 28	—	—	—	—
CHI 29	—	2.5	—	—
CHI 30	3.2	2.55	2.8	2.8
CHI 35	—	—	—	—
CHI 40	—	—	—	—
CHI 42	—	—	—	—
CHI 43	—	—	—	—
CHI 45	—	—	—	—
CHI 46	—	—	—	—
CHI 47	—	—	—	—
CHI 48	—	—	—	—
CHI 49	—	—	1.2	—
CHI 52	—	—	—	—
CHI 54	—	—	—	—
CHI 55	—	—	—	—
CHI 57	—	—	—	—
CHI 60	—	—	—	—
CHI 61	—	—	—	—
CHI 63	—	—	—	—
CHI 85	ND	ND	ND	ND
CHI 91	ND	ND	ND	ND
CHI 95	—	—	—	—
CHI 104	—	—	—	—

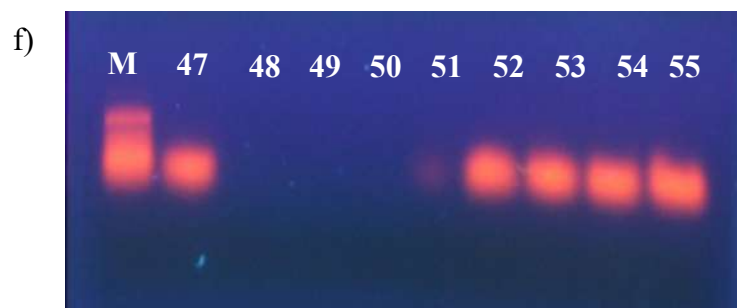
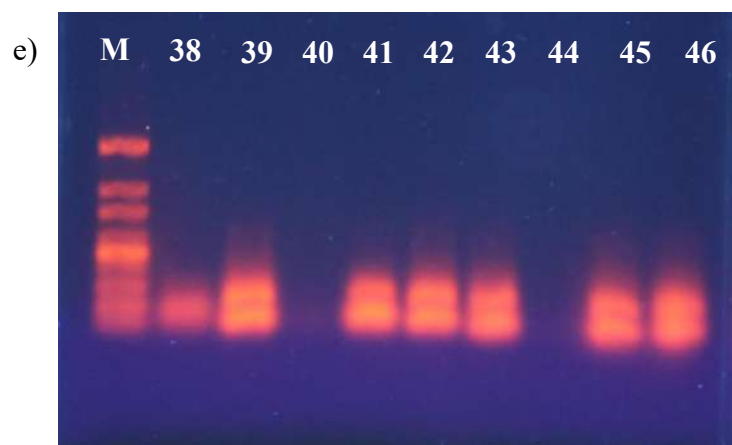
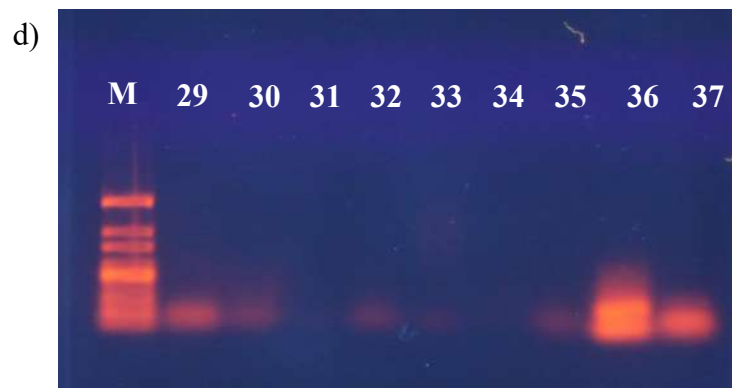
CHI 105	ND	ND	ND	ND
CHI 106	–	–	–	–
CHI 108	–	–	–	–
CHI 112	–	–	–	–
CHI 118	ND	ND	ND	ND
CHI 119	ND	ND	ND	ND
CHI 123	–	–	–	–
CHI 126	–	–	–	–
CHI 129	–	–	–	–
CHI 134	–	–	–	–
CHI 139	ND	ND	ND	ND
CHI 140	–	–	–	–
CHI 141	ND	ND	ND	ND
CHI 142	–	–	–	–
CHI 143	–	–	–	–
CHI 144	–	–	–	–
CHI 146	–	–	–	–
CHI 147	ND	ND	ND	ND
CHI 148	ND	ND	ND	ND
CHI 150	–	–	–	–
CHI 152	–	–	–	–
CHI 153	–	–	–	–
CHI 157	ND	ND	ND	ND
LAR 2	ND	ND	ND	ND
LAR 3	ND	ND	ND	ND
LAR 4	–	–	–	–
LAR 5	ND	ND	ND	ND
LAR 6	ND	ND	ND	ND
LAR 7	ND	ND	ND	ND
LAR 8	ND	ND	ND	ND

LAR 12	ND	ND	ND	ND
LAR 13	ND	ND	ND	ND
LAR 15	ND	ND	ND	ND
LAR 16	ND	ND	ND	ND
LAR 17	ND	ND	ND	ND
LAR 19	ND	ND	ND	ND
LAR 20	ND	ND	ND	ND
LAR 22	ND	ND	ND	ND
LAR 25	ND	ND	ND	ND
LAR 31	ND	ND	ND	ND
LAR 39	ND	ND	ND	ND
LAR 40	ND	ND	ND	ND
LAR 45	ND	ND	ND	ND
LAR 48	ND	ND	ND	ND
LAR 49	ND	ND	ND	ND
LAR 57	ND	ND	ND	ND
SHA 1	ND	ND	ND	ND
SHA 2	ND	ND	ND	ND
SHA 13	ND	ND	ND	ND
SHA 15	ND	ND	ND	ND
SHA 16	ND	ND	ND	ND
SHA 17	ND	ND	ND	ND
NEV 11	ND	ND	ND	ND
NEV 39	ND	ND	ND	ND
NEV 41	ND	ND	ND	ND
NEV 47	ND	ND	ND	ND
FW 41	ND	ND	ND	ND
FW 42	—	—	—	1.1

Los valores representan el promedio de dos ensayos completamente independientes, la desviación estándar fue inferior al 3%. CHI (Chiapas, México), SHA (Sahara, África), FW (Fort Whyte, Canadá), LAR (Lago Arareco, Chihuahua), NEV (Nevada, EUA), (—) Prueba Negativa, (ND) No determinado, cm (Centímetros), ds (Desviación estándar).

Por otro lado, se llevo a cabo la identificación mediante PCR la búsqueda del gen PKS en 55 actinomicetos seleccionados del total de 180 evaluados. Sin embargo, estos resultados se consideran preliminares debido a que no se logro optimizar las condiciones de la misma PCR debido a la condición de los oligonucleótidos empleados, al ser degenerados ocasionan un bandeo inespecífico.





**Figura 7.** Amplicones de PCR mediante electrophoresis en gel de agarosa al 0.7% utilizando GelRed. Imagen revelada mediante un transluminador UV (MultiDoc-It Digital Imaging System by UVP) Carril 1: Marcador, Carriles 2-10: Muestras (1 -9) (a), Muestras (10-18) (b), Muestras (19-28) (c), Muestras (29-37) (d), Muestras (38-46) (e) y Muestras (47-55) (f).



**Tabla 4. Cepas de actinomicetos utilizados para identificación del gen PKS.**

<b>Muestra</b>	<b>Cepa</b>	<b>Muestra</b>	<b>Cepa</b>
<b>1</b>	CHI 29	<b>29</b>	CHI 95
<b>2</b>	CHI 30	<b>30</b>	CHI 104
<b>3</b>	CHI 35	<b>31</b>	FW 41
<b>4</b>	CHI 40	<b>32</b>	CHI 2
<b>5</b>	CHI 9	<b>33</b>	CHI 42
<b>6</b>	CHI 10	<b>34</b>	CHI 43
<b>7</b>	CHI 27	<b>35</b>	CHI 45
<b>8</b>	CHI28	<b>36</b>	CHI 46
<b>9</b>	CHI 47	<b>37</b>	LAR 6
<b>10</b>	CHI 48	<b>38</b>	LAR 7
<b>11</b>	CHI 49	<b>39</b>	LAR 3
<b>12</b>	CHI 52	<b>40</b>	LAR 40
<b>13</b>	CHI 153	<b>41</b>	LAR 5
<b>14</b>	CHI 157	<b>42</b>	CHI 61
<b>15</b>	FW 42	<b>43</b>	CHI 63
<b>16</b>	CHI 112	<b>44</b>	LAR 17
<b>17</b>	CHI 118	<b>45</b>	LAR 15
<b>18</b>	CHI 106	<b>46</b>	LAR 48
<b>19</b>	CHI 108	<b>47</b>	LAR 57
<b>20</b>	CHI 142	<b>48</b>	SHA 15
<b>22</b>	CHI 146	<b>49</b>	SHA 13
<b>23</b>	CHI 139	<b>50</b>	SHA 2
<b>24</b>	CHI 140	<b>51</b>	LAR 31
<b>25</b>	CHI 54	<b>52</b>	CHI 152
<b>26</b>	CHI 55	<b>53</b>	CHI 147
<b>27</b>	CHI 57	<b>54</b>	CHI 150
<b>28</b>	CHI 60	<b>55</b>	LAR 25

## 8. DISCUSIÓN

Los actinomicetos son microorganismos capaces de producir una gran gama de compuestos bioactivos que pueden usarse en diversas áreas, entre ellas el biocontrol de vectores de interés. Estos microorganismos son capaces de producir enzimas como quitinasas, proteasas, lipasas y esterases que han sido relacionadas en provocar toxicidad en vectores como el mosquito al causarles un retraso en su desarrollo, así como inducir su muerte (Janardhan et al. 2018). La producción de enzimas es un proceso interrelacionado con la producción de metabolitos secundarios, por lo cual, si hay producción enzimática, se infiere que hay metabolitos secundarios de interés con las características deseadas, en este caso con capacidad insecticida (Hitzenhammer et al. 2019).

En el presente estudio, se realizó una caracterización enzimática con el fin de seleccionar aquellos que presenten la mayoría de las enzimas de interés. Se aislaron 180 actinomicetos de diferentes regiones: CHI (Chiapas, México), LAR (Lago de Arareco, Chihuahua), SHA (Sahara, África), NEV (Nevada, E.U.A) y FW (Forty Whyte, Canadá), así como de diferentes ecosistemas tanto terrestres como acuáticos, ya que una ventaja de los actinomicetos es su diversidad al estar presentes en distintos ecosistemas, lo que los hace microorganismos de fácil acceso. En un estudio realizado por (Fatmawati et al. 2019), determinaron actividad quitinasa para actinomicetos aislados de Indonesia. Se aislaron 23 actinomicetos, dentro de los cuales solo una cepa tuvo un índice de degradación  $\geq 2$  cm, siendo la cepa ASR 67 donde su índice fue de 3, sin embargo, las 22 cepas restantes tuvieron un índice menor a 1cm. Por el contrario, en el presente estudio, se seleccionaron 85 actinomicetos, de los 180 evaluados, de los cuales obtuvimos que el 72% obtuvo un índice de degradación  $\geq 2$  cm, donde se destacan las cepas CHI 10, CHI 27, CHI 29, CHI 42, CHI 45, CHI 49, CHI 52, CHI 54, CHI 55, LAR 8, LAR 16, LAR 48, SHA 2, SHA 13, SHA 15, NEV 11, NEV 39, FW 4, entre otras; por otro lado, las cepas LAR 2, CHI 148, CHI 46, NEV 39 que obtuvieron un índice de degradación mucho menor de alrededor de  $\cong 0.7-1.1$  cm (Tabla 1). Cabe destacar que la cepa LAR 12 obtuvo un índice de degradación de 0, por lo cuál, al presentar una actividad quitinolítica nula, no se consideraría para ensayos posteriores, ya que la enzima quitinasa es uno de los compuestos

principales que se ha reportado de mayor importancia en el control de plagas y parásitos de importancia debido a que esta enzima es la responsable de retrasar el desarrollo en varios estadios de crecimiento de dichos insectos (Hamadah 2018). A su vez, la cutícula de los insectos consiste principalmente de quitina, por lo cual, la quitinasa que producen estos actinomicetos es primordial para realizar una estrategia para el control de este tipo de vectores (Bouthina et al. 2015).

En la India (Narayana and Vijayalakshmi 2008), llevaron a cabo un estudio de aislamiento de actinomicetos para la producción de proteasas. Entre ellos, se identificó a *Streptomyces albidoflavus* donde presentó una actividad proteolítica a las 24 h de incubación y con un nivel máximo a las 72 h. En ese sentido, en el estudio realizado, para la actividad de proteasa el 65% presentó degradación en el medio lo que corresponde a un resultado positivo. Podemos destacar la actividad de las cepas CHI 123 y LAR 8, que presentaron un nivel máximo de actividad en tan solo 24 h (Figura 3a), asimismo para las cepas CHI 112 y CHI 42, que presentaron gran actividad proteolítica a las 24 h de incubación (Figura 3b y c). Esta enzima es importante debido a que varios tipos de insectos, entre ellos *Ae. aegypti*, contiene proteasas en su tracto digestivo que son importantes para su funcionamiento de digestión (Shamsi et al. 2018). por lo cual en este sentido el que los actinomicetos hayan presentado actividad proteolítica es de suma importancia debido a que la degradación de estas enzimas esta relacionado con reducir la absorción de aminoácidos esenciales por parte del vector llevándolos a una etapa de inanición y como consecuencia disminuir la supervivencia de huevos, peso larval y a su vez, la muerte (Yosri, Abdel-aziz, and Sayed 2018).

En un estudio realizado en Irán por (Hamedi, Kafshnouchi, and Ranjbaran 2019), se llevó a cabo la determinación de la enzima lipasa mediante el uso de medio rodamina B, donde los resultados positivos se determinan por luz UV para ver si el microorganismo genera fluorescencia, lo que significada actividad de lipasa debido a la interacción de rodamina B con los ácidos grasos que se liberan durante la hidrolisis de triglicéridos. En las cepas evaluadas en este estudio, para la actividad de lipasa, el 85% presentó un cambio de color de rojo a amarillo a excepción de algunas cepas como CHI 46, CHI 47, SHA 15, NEV39,

NEV 47, entre otras. (Tabla 2). Cabe destacar, que en este caso se utilizó agar rojo de fenol, donde el fundamento a diferencia del propuesto por (Hamed, Kafshnouchi, and Ranjbaran 2019), se basa en un cambio de color debido a los ácidos grasos libres que son liberados por la reacción de la lipólisis de los actinomicetos, lo que ocasiona un viraje en el pH (Lee et al. 2015). La importancia en la producción de esta enzima recae en los diferentes efectos que esta tiene en este tipo de vectores al desempeñar un papel importante en el almacenamiento y movilización de lípidos (Dellali, Karam, and Karam 2020). El modo de acción de la lipasa causa efectos histológicos que incluye tanto necrosis como destrucción de células intestinales. Además la reducción de lipasa en los insectos afecta la unión de enzimas digestivas lo que causa un efecto donde el insecto no se puede alimentar, lo que bien si no mata al insecto de manera directa lo lleva a la muerte por el estado de inanición que le provoca (Ali et al. 2017).

Por último, la prueba de esterasas, el 95% presentó un comportamiento positivo debido a la precipitación de sales de calcio que contiene el medio, sin embargo, cepas como CHI 27, CHI 57, CHI 91, LAR 4, LAR 13, SHA 15, NEV 47, entre otras, presentaron nula actividad (Tabla 2). Esto concuerda con lo realizado por (Zainab and Batool 2018), donde se aislaron 10 muestras de suelo de diferentes regiones de Karachi, Pakistán. La actividad de esterasas fue determinada mediante el uso de Tween 80 y tomaron como positivos todos aquellos donde se observaba una precipitación en el medio por la grasa insaturada liberada debido a la hidrólisis del Tween. Asimismo, las esterasas son enzimas esenciales en los insectos al desempeñar un papel importante a nivel fisiológico y bioquímico al participar en cualquier acción que derive estrés en ellos. Son enzimas clave que están implicadas en el metabolismo de hormonas, digestión así como la resistencia a diferentes tipos de insecticidas (Pavunraj et al. 2017). Por lo cual, el que los actinomicetos tengan producción de esta enzima se infiere que puede debilitar al insecto en cualquiera de estos roles que desempeña provocando una disminución en su supervivencia en diferentes estadios larvarios (Y. Huang et al. 2019).

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, los actinomicetos son capaces de producir infinidad de compuestos bioactivos y dicha presencia esta altamente relacionada

con las condiciones ambientales en las que se desarrollan tal como la humedad, temperatura o pH (Charousová et al. 2019). En ese sentido, comparado con otros compuestos producidos por diferentes grupos de microorganismos, los actinomicetos son un grupo que por sí mismos pueden producir alrededor de 10,100 compuestos. Los géneros como *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora* son algunos de los géneros de actinomicetos mas conocidos que producen una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Gozari et al. 2019). Entre los metabolitos secundarios que se han reportado que producen los actinomicetos están la daptomicina, lincomicina, estreptomicina, vancomicina y gentamicina, los cuales han sido utilizados contra microorganismos patógenos de interés. Por lo anterior, hoy en día, se requieren de nuevos tipos de antibióticos que ayuden al control de enfermedades infecciosas y a su vez, ayuden al control de vectores como el mosquito *Ae. aegypti* (Balakrishnan, Santhanam, and Srinivasan 2017), por ello, en el presente estudio se llevó a cabo la evaluación antimicrobiana de 42 actinomicetos contra bacterias patógenas de interés como lo son: *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *S. enteritidis* y *S. Typhimurium* donde como resultado se obtuvo que 37 cepas no tuvieron resultado alguno de inhibición mientras que las cepas provenientes de Chiapas, México como CHI 30 tuvo un halo de inhibición 3.2 cm contra *K. pneumoniae* (Figura 6 a), mientras que las cepas CHI 27, CHI 29 y CHI 30 resultaron de manera favorable contra *S. aureus* con halos de inhibición desde 3.35, 2.5 y 2.55 cm, respectivamente (Figura 6 b) (Tabla 3). Por otro lado, los actinomicetos utilizados contra *S. enteritidis*, las cepas que dieron resultados positivos fueron CHI 30 y CHI 49, con halos de inhibición de 2.8 cm y 1.2 cm (Figura 6c). Por último, las únicas cepas que dieron resultados favorables contra *S. Typhimurium* fueron las provenientes de Chiapas, México y Forty Whyte, Canadá, donde se obtuvieron halos de inhibición de 2.8 cm para CHI 30 y 1.1 cm para FW 42, respectivamente (Figura 6d).

Esto concuerda con lo realizado por (Ouchari et al. 2019) donde aislaron actinomicetos de dunas de arena de Merzouga, del desierto del Sahara y las probaron contra diferentes microorganismos patógenos como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* y *C. albicans*. En dicho estudio, obtuvieron halos de inhibición de alrededor de 5 a 6 cm para *S. aureus* y para *S. enteritidis* de 3 a 4 cm. Esto comprueba que los actinomicetos son un grupo amplio de microorganismos que tienen la habilidad de producir compuestos

bioactivos inhibitorios contra diferentes microorganismos patógenos de interés en la salud humana.

Se realizó la identificación del gen PKS mediante PCR, sin embargo, los resultados obtenidos no fueron los esperados al no determinar de manera concreta si los productos amplificados correspondían a nuestro gen de interés. Lo anterior es debido a que se utilizaron primers degenerados, que a pesar de ser específicos para dicho gen, no se logró optimizar las condiciones para obtener el producto deseado al tener bandeos inespecíficos en la mayoría de las muestras evaluadas (Figura 7). Cabe destacar, que el uso de oligonucleótidos degenerados pueden tener tanto ventajas como desventajas como mencionan (Elbrecht, Hebert, and Steinke 2018) donde realizaron un estudio evaluando el uso de oligonucleótidos degenerados, que si bien puede ayudar a la amplificación de regiones complejas puede ocasionar dificultad analítica a la hora de la interpretación de resultados debido a que se genera un deslizamiento donde se genera la amplificación de varios fragmentos que pueden ser mas cortos o largos a la longitud del amplicón que se espera o generar un traslape en diferentes pesos moleculares, que fue lo que podemos inferir que paso en el presente estudio al no poder determinar de manera concreta si nuestro producto es un resultado certero (Campos and Quesada 2017).

Adicional a ello, debido a que los actinomicetos son capaces de producir este tipo de enzimas y metabolitos con actividad antimicrobiana, se infiere que cuentan con un grupo de genes que les confiere dicha capacidad de producir estos compuestos bioactivos, también llamados como policétidos sintetas. En este grupo de genes se encuentran metabolitos secundarios como macrólidos y avermectinas que tienen actividad insecticida. Tanto los macrólidos como avermectinas son sintetizados por rutas de genes PKS tipo I y II, por lo cuál, la caracterización del gen PKS en las cepas con mejor actividad enzimática es necesaria para poder verificar nuestros resultados y que puedan ser empleados como posibles agentes de biocontrol contra *Ae. aegypti* (Risidian, Mozef, and Wink 2019).

## 9. CONCLUSIONES

De las 85 cepas evaluadas

- El 72% fueron positivas para quitinasa
- El 65% fueron positivas para proteasa
- El 85% para lipasa (rojo de fenol)
- El 95% para esterasa

Los actinomicetos con resultado inhibitorio para las diferentes bacterias patógenas:

- *Klebsiella pneumoniae*: CHI 30
- *S. aureus*: CHI 27, CHI 29 y CHI 30
- *S. enteritidis*: CHI 30 y CHI 49
- *S. Typhimurium*: CHI 30 y FW 42

En base a las conclusiones anteriores, los actinomicetos evaluados, tienen potencial de ser empleados como agentes de control biológico contra *Ae. aegypti* al producir enzimas hidrolíticas de importancia además de tener actividad inhibitoria contra bacterias patógenas de interés. Sin embargo, con el fin de determinar esto, será necesaria la detección del PKS y finalmente, a partir de esto, evaluar la capacidad de estos actinomicetos en la producción de metabolitos con actividad insecticida y/o retraso en el crecimiento de este vector.

## **10.PERSPECTIVAS**

Estandarizar de manera adecuada las condiciones de PCR para los oligonucleótidos degenerados específicos para el gen PKS.

Probar aquellos actinomicetos con mayor actividad enzimática, antimicrobiana y con presencia del gen PKS a larvas y pupas de *Ae. aegypti*.

Determinar genes que han sido reportados con actividad insecticida como avermectinas, macrólidos y spinosidos en actinomicetos.

Purificar e identificar los compuestos bioactivos que son responsables de la actividad larvicida en los actinomicetos nativos.



## 11.BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, Saboor et al. 2017. "Epidemiology of dengue in pakistan , present prevalence and guidelines for future control." *International journal of mosquito research* 4(6): 25–32.
- Ali, Ali M, Doaa S Mohamed, El-sayed H Shaurub, and Asmaa M Elsayed. 2017. "Antifeedant activity and some biochemical effects of garlic and lemon essential oils on *spodoptera littoralis* (boisduval ) (Lepidoptera : Noctuidae )." *Journal of entomology and zoology studies* 5(3): 1476–82.
- Alnahdi, Hanan S. 2012. "Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus sp* environmental samples and screened their capability of protease." 2(9): 71–74.
- Anoopkumar, A N et al. 2017. "Life Cycle , Bio-ecology and DNA barcoding of mosquitoes *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (skuse)." *ADR Journals* 49(3): 32–41.
- Balakrishnan, S., P. Santhanam, and M. Srinivasan. 2017. "Larvicidal potency of marine actinobacteria isolated from mangrove environment against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*." *Journal of Parasitic Diseases* 41(2): 387–94.
- Barragán, Baldómero Sánchez et al. 2016. "Predictores clínicos tempranos de dengue hemorrágico en el sureste de México." *Salud en Tabasco* 22(3).
- Basurto-Zambrano, Xavier A. 2016. "Algunas consideraciones generales clínicas epidemiológicas del dengue." *Dominio de las Ciencias* 2: 247–58.
- Bouthina, A M, H Radi, A A Nagwa, and S A Raghda. 2015. "Toxicological activity of indigenous chitinolytic streptomyces species against *Culex pipiens* (Diptera – Culicidae )." *International Journal of Microbiological Research* 6(3): 211–18.
- Campos, Maria Jorge, and Alberto Quesada. 2017. "Strategies to improve efficiency and specificity of degenerate primers in PCR." In *PCR: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, , 75–85.
- Charousová, Ivana et al. 2019. "Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain krg-1 isolated from Karoo , South Africa." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 55(7249): 1–11.
- Danis-Lozano, Rogelio et al. 2019. "Vertical transmission of dengue virus in *Aedes*

*aegypti* and its role in the epidemiological persistence of dengue in central.” *Tropical Medicine and International Health* 00(00): 1–9.

Dellali, Amina, Halima Zadi Karam, and Nour-eddine Karam. 2020. “Lipase and esterase activities of lactic acid bacteria isolated from different biotopes.” *African Journal of Biotechnology* 19(4): 156–64.

Elbrecht, Vasco, Paul D. N. Hebert, and Dirk Steinke. 2018. “Slippage of degenerate primers can cause variation in amplicon length.” *Scientific Reports* 8(10999): 1–5. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-29364-z>.

Escobar, Osmany Enrique Tamayo et al. 2019. “La reemergencia del dengue: un gran desafío para el sistema sanitario latinoamericano y caribeño en pleno siglo XXI.” *MEDISAN* 23(2): 308–24.

Fatmawati, Umi, Anja Meryandini, Abdjad Asih Nawangsih, and Aris Tri Wahyudi. 2019. “Screening and characterization of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere for promoting plant growth.” 20(10): 2970–77.

Frantchez, Victoria et al. 2016. “Dengue en adultos : diagnóstico , tratamiento y abordaje de situaciones especiales.” 32(1): 43–51.

Galavíz-Parada, Juan D. et al. 2016. “Control químico y biológico de larvas de *Aedes aegypti* en la Costa Norte de Jalisco , México” 68(2): 111–24.

Galicia, Ivonne Torres, David Cortés Poza, and Ingeborg Becker. 2015. “Dengue en México: incremento en la población juvenil durante la última década.” *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 71(4): 196–201.

García, Cesar López et al. 2019. “Description of the dengue problem with a focus on the social determinants of health in a community: field study.” *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 17(655): 6–15.

Gozari, Mohsen et al. 2019. “Screening and characterization of marine actinomycetes from the Northern Oman Sea sediments for cytotoxic and antimicrobial activity.” *International Microbiology* 22: 521–30.

Hamadah, Khalid. 2018. “The Insecticidal activity of actinomycete metabolites, against the mosquito *Culex pipiens*.” *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology* 4(1): 103–13.

Hamed, Javad, Maghsoud Kafshnouchi, and Mohsen Ranjbaran. 2019. “A study on

- actinobacterial diversity of hampoeil cave and screening of their biological activities.” *Saudi Journal of Biological Sciences* 26(7): 1587–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.10.010>.
- Hitzenhammer, Eva et al. 2019. “YPR2 is a regulator of light modulated carbon and secondary metabolism in *Trichoderma reesei*.” *BMC Genomics* 20(211): 1–14.
- Huang, Yan-Jang S., Stephen Higgs, and Dana L. Vanlandingham. 2017. “Biological control strategies for mosquito vectors of arboviruses.” *Insects* 8(21): 1–25.
- Huang, Yuting et al. 2019. “Chemical composition and larvicidal activity against aedes mosquitoes of essential oils from *Arisaema Fargesii*.” *Society of Chemical Industry*: 1–9.
- Isah, U., I.A. Raubilu, and M.A. Ahmad. 2019. “Microorganisms as bioinsecticides ; short review.” *Journal of Pure and Applied Sciences* 12(1): 274–79.
- Janardhan, Avilala et al. 2018. “Antiviral and larvicidal properties of novel bioactive compounds produced from marine actinomycetes.” *Journal of Marine Biology* 44(5): 424–28.
- Jiang, Yi, Qinyuan Li, Xiu Chen, and Chenglin Jiang. 2016. “Isolation and cultivation methods of actinobacteria.”
- Kaur, Rajveer, Gurjot Kaur Mavi, Shweta Raghav, and Injeela Khan. 2019. “Pesticides classification and its impact on environment.” *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8(03): 1889–97.
- Krzesniak, Katarzyna Jakubiec et al. 2018. “Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial , antifungal and antiviral properties.” *Polish Journal of Microbiology* 67(3): 259–72.
- Lee, Li Pin et al. 2015. “Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat : promising strains to alleviate oil pollution.” *BioMed Research International*: 1–10.
- López, Edgar Dehesa, and Aldo Gutiérrez Alatorre. 2019. “Dengue : news and epidemiological characteristics in México.” *REVMEDUAS* 9(3): 159–70.
- Lubinda, Jailos et al. 2019. “Environmental suitability for *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and the spatial distribution of major arboviral infections in Mexico.” *Parasite Epidemiology and Contro* 6(116): 1–10.
- Narayana, K.J.P, and M. Vijayalakshmi. 2008. “Production of extracellular protease by *Streptomyces albidoflavus*.” *Asian Journal of Biochemistry* 3(3): 198–202.

- Noskov, Yuriy A et al. 2019. "Combined effect of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* and avermectins on the survival and immune response of *Aedes aegypti* larvae." *Peer J*: 1–23.
- Ortega-Morales, Aldo I. et al. 2019. "The mosquitoes (Diptera : Culicidae ) of Nuevo León, México, with descriptions of two new leo." *PLoS ONE* 14(8): 1–26.
- Ouchari, Lahcen, Amal Boukeskase, Brahim Bouizgarne, and Yedir Ouhdouch. 2019. "Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from the unexplored hot merzouga desert and their taxonomic diversity." *The Company of Biologists* 8: 1–7.
- Paulraj, M. Gabriel, P. Saravana Kumar, S. Ignacimuthu, and D. Sukumaran. 2016. "Natural insecticides from actinomycetes and other microbes for vector mosquito control." : 85–99.
- Pavunraj, M et al. 2017. "Larvicidal and enzyme inhibitory effects of *Acalypha fruticosa* (f.) and *Catharanthus roseus* l (g) don. leaf extracts against *Culex quinquefasciatus* (SAY.) (Diptera: Culicidae)." *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 10(3): 1–8.
- Powell, Jeffrey R., Andrea Gloria-Soria, and Panayiota Kotsakiozi. 2018. "Recent history of *Aedes aegypti* : vector genomics and epidemiology records." *Bioscience* 68(11): 854–60.
- Reinhold, Joanna M., Claudio R. Lazzari, and Chloé Lahondère. 2018. "Effects of the environmental temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes : a review." *Insects* 158(9): 1–17.
- Risdian, Chandra, Tjandrawati Mozef, and Joachim Wink. 2019. "Biosynthesis of polyketides in *Streptomyces*." *Microorganisms* 7(124): 1–18.
- Shamsi, Tooba Naz et al. 2018. "Inhibition of gut proteases and development of dengue vector , *Aedes aegypti* by *Allium sativum* protease inhibitor." *Acta Ecologica Sinica*: 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.01.002>.
- Sharma, Vivek, and Richa Salwan. 2018. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering biocontrol potential and applications of actinobacteria in agriculture. Elsevier B.V. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00006-0>.
- Weeratunga, Praveen, Rodrigo Chaturaka, Fernando Sumadhya Deepika, and Rajapakse Senaka. 2017. "Control methods for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (protocol)."

*Cochrane Database of Systematic Reviews* 1(8): 1–10.


Yosri, Mohamed, Marwa M Abdel-aziz, and R M Sayed. 2018. “Larvicidal potential of irradiated myco-insecticide from *Metarhizium anisopliae* and larvicidal synergistic effect with its mycosynthesized titanium nanoparticles (TiNPs).” *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 11(4): 328–34. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.06.001>.

Zainab, Kashmala, and Hira Batool. 2018. “A simplistic screening assay of antimicrobial compounds and enzymatic activity from local soil microbes.” *RADS J. Biol. Res. Appl. Sci.* 9(1): 24–29.

## 12.ANEXOS

### Anexo 1

**Presentación de cartel:** CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE ACTINOMICETOS PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIONES DEL PAÍS. IV Congreso de Diversidad Biológica, Octubre 2020, Gómez Palacio, Durango.



La Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, otorga la presente:

# CONSTANCIA

a: DANIELA CERDA-APRESA  
MARÍA ELIZABETH ALEMÁN-HUERTA, KATTUSHKA ÁREVALO-NIÑO Y  
MA GUADALUPE ROJAS-VERDE

por su participación como PONENTE en modalidad CARTEL del tema:


**“CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE ACTINOMICETOS PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIONES DEL PAÍS”**

durante el 4to Congreso de Diversidad Biológica,  
realizado del 26 al 30 de Octubre 2020 en modalidad en línea,  
con sede en Gómez Palacio, Durango.

ATENTAMENTE  
“Por mi raza hablará el espíritu”  
A 30 de Octubre 2020, Gómez Palacio, Durango.



Jorge Sáenz Mata  
Coordinador General  
4to Congreso de Diversidad Biológica



PROYECTO APOYADO POR CONACYT

## Anexo 2

**Presentación de cartel:** CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE ACTINOMICETOS NATIVOS COMO POSIBLES AGENTES DE BIOCONTROL CONTRA *Aedes aegypti*. VII Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y V Simposio Nacional de Microbiología Aplicada, octubre 2020, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.





### Anexo 3

**Parte del proyecto:** INHIBICIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS DE INTERÉS, DETERIORANTES Y PATÓGENOS POR ACTINOMICETOS NATIVOS, XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Junio 2019, León, Guanajuato.





#### Anexo 4

**Parte del proyecto:** ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE ACTINOMICETOS NATIVOS AISLADOS DE DIVERSAS REGIONES DE MÉXICO Y CANADÁ, XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Junio 2019, León, Guanajuato.



## Anexo 5

**Parte del proyecto:** INHIBICIÓN DE HONGOS AFLATOXIGÉNICOS Y FITOPATÓGENOS, ASÍ COMO BACTERIAS DE INTERÉS DETERIORANTES Y PATÓGENAS POR ACTINOMICETOS NATIVOS, VI Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y IV Simposio Nacional de Microbiología Aplicada, Abril 2019, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.



## Anexo 6

**Parte del proyecto:** ANÁLISIS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EN ACTINOMICETOS AISLADOS DE MÉXICO Y CANADÁ, VI Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y IV Simposio Nacional de Microbiología Aplicada, Abril 2019, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

